ISSN 0073 - 9901
MIBUAH



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO, SP — BRASIL

Memórias do Instituto Butantan

VOLUME 50 NÚMERO 1, 1988

As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

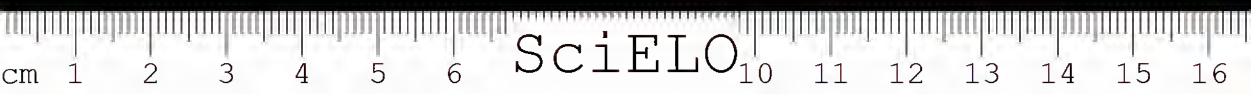
São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsability for statements and opinions advanced by contributors.

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Excerpta Médica, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05504 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 211-8211 — R. 129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR

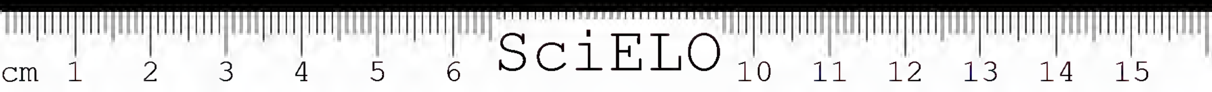


Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan — São Paulo - SP — Brasil

MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN

Volume 50, número 1, 1988

São Paulo, SP — Brasil
1988



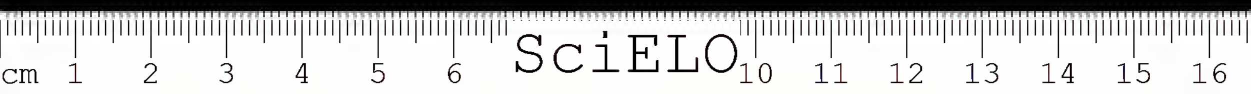
MEMÓRIAS do INSTITUTO BUTANTAN. (Secretaria de Estado da Saúde)
São Paulo, SP — Brasil, 1918 —

1918 — 1983/84, **1-47/48**
Publicação interrompida de 1985 a 1986
1987, **49**(1-3)
1988, **50**(1

ISSN 0073-9901
MIBUAH

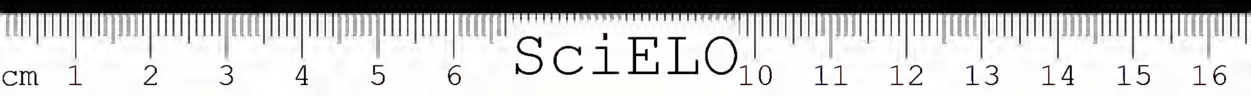
CDD 614.07205

Solicita-se permuta/Exchange desired



Mem. Inst. Butantan
50(1), 1988

SUMÁRIO/SUMMARY


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
50(1): 5-14, 1988.

KARL HEINRICH SLOTTA
1892-1987



"Qu'est-ce qu'un homme révolté? Un homme qui dit non. Mais s'il refuse, il ne renonce pas... D'une certaine manière, il oppose à l'ordre qui l'opprime une sorte de droit à ne pas être opprimé au delà de ce qu'il peut admettre."

Albert Camus, L'Homme Révolté, 1951

Karl H. SLOTTA, descobridor da PROGESTERONA, nasceu em Breslau, Alemanha (hoje Wroclaw, Polônia) em 12 de maio de 1895 e deu o seu último alento em Miami, em 17 de julho de 1987, aos 92 anos de idade.

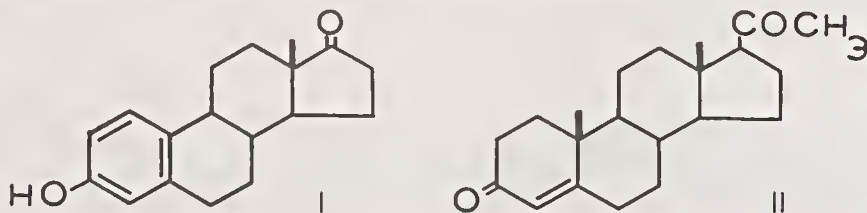
A sua carreira científica configura uma extraordinária trajetória que se iniciou na Universidade de Breslau de 1919 a 1935, prosseguiu no Brasil onde lançou as bases da Química e da Farmacologia experimental no Instituto Butantan no período de 1935 a 1938, e alcançou a América do Norte, onde atuou, a partir de 1957, como Professor de Bioquímica da Universidade de Miami.

As suas contribuições abrangem a síntese de produtos naturais, a química dos hormônios sexuais, os constituintes do café e as toxinas dos venenos ofídicos, tendo se projetado no cenário mundial pela descoberta da progesterona em 1934 e pelo isolamento da primeira toxina cristalizada do veneno de cascavel, a crotoxina, em 1938.

Após lutar na Primeira Guerra Mundial e sofrer graves ferimentos, o jovem tenente Slotta ingressa em 1919, aos 24 anos, na Universidade de sua cidade natal, Breslau. Em poucos anos, sob a orientação de Heinrich Biltz, vence as etapas do currículo universitário até defender tese de doutoramento em 1928. Logo mais dá início a uma brilhante carreira acadêmica, ao tornar-se Livre-docente em 1929 e Professor do Instituto de Química da Universidade de Breslau em 1935.

Na década de 20, o mundo da fisiologia estava voltado para os fenômenos da reprodução humana. O ano de 1930 presenciou a descoberta da ESTRONA (I), isolada independentemente nos laboratórios de Doisy, na Universidade de St. Louis, e de Butenandt, na Universidade de Gottingen. Outrossim, já em 1903, Ludwig Fraenkel, então Professor de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina de Breslau, havia desvendado a natureza endócrina do corpo amarelo: este tecido de cor amarela, em virtude da alta concentração em caroteno, exerce importantes funções: impede a ovulação, mantém as condições favoráveis ao desenvolvimento do embrião e das glândulas mamárias. Convencido de que esta estrutura secretava um hormônio essencial à função de reprodução, Fraenkel sugeriu a Karl Slotta uma pesquisa química que possibilitasse a identificação dos seus princípios ativos.

Em trabalhos ininterruptos e a partir de ovários de porcas, Slotta conseguiu isolar a PROGESTERONA (II). A pesquisa foi publicada nos "*Berichte der Deutschen Chemisches Gesellschaft*", em 1934, sendo co-autores o químico H. Ruschig e o médico E. Fels. Por se tratar do segundo hormônio feminino descoberto, o trabalho teve uma enorme repercussão. Tão-somente Karl Slotta isolou a progesterona, determinou também a sua estrutura molecular, uma façanha que tinha poucos precedentes nos anais dos Produtos Naturais da época. Na clássica obra "STEROIDS", Fieser e Fieser prestam a seguinte homenagem ao talento de Slotta: "The absorption spectrum of progesterone indicated the presence of an α,β unsaturated keto grouping and X-Ray studies pointed to a sterol-like molecule. On the basis of these limited observations, Slotta proposed a formula which shortly proved to be correct by partial synthesis."



No mesmo ano de 1934, três outros laboratórios anunciaram o isolamento da progesterona: os de Butenandt (Alemanha), de Wintersteiner (Estados Unidos) e da Ciba S.A. (Suíça).

Homem de profunda visão humanista, casado com a Dra. Maja Fraenkel, de ascendência judaica, Karl Slotta ficou indignado e revoltado com o regime racista implantado pelo nazismo na sua pátria. Atendendo ao convite do Governo do Estado de São Paulo, mudou-se com a família em 1935 para São Paulo, onde recebeu a incumbência de dirigir a recém-criada "Secção de Chimica e Pharmacologia Experimentaes" do Instituto Butantan, tendo como assistentes os Drs. K. Neisser, G. Szyska e José Ribeiro do Valle. No preâmbulo da obra "Rattlesnake Venoms", editada por A.T.Tu (1982), Karl Slotta escreveu: "In 1935, the government of the State of São Paulo offered me the directorship of the newly established chemical department in its world-famous snake and venom Instituto Butantan. Strangely enough I was not asked to work on snake venoms but rather to continue my research of sex hormones and also to enter a new field: the chemistry of coffee... However my prime interest was to do research on snake venom... I started this research finally in early 1937 and came to the conclusion that rattle snake venom might be a protein... In 1938 we crystallized what we called 'crotoxin' and determined its molecular structure. In a way, this discovery may have provided the impetus for world-wide research on animal venoms, the founding of the International Society on Toxinology in 1962 and its publication *Toxicon*, and all the great achievements up to the present time: research on snake venoms, neurotoxins, phospholipase A, L-aminoacid oxidase and hemolysis and blood coagulation and the search for the pharmacological effects of all animal venoms."

No noticiário do Tomo XI das *Memórias do Instituto Butantan* (1937), destacamos o seguinte: "... É pois, com especial agrado que, neste tomo, se anuncia a publicação de uma grande serie de trabalhos sobre chimica, a versarem uns sobre a natureza dos hormonios sexuais, outros sobre a composição do café e outros, finalmente, sobre os principios constituintes dos venenos dos batrachios e dos ophidios". De fato, são quatorze trabalhos a cargo do grupo de pesquisadores liderados pelo Professor Slotta, prenunciando uma outra serie de publicações que surgem no Tomo XII (1938), sendo a mais notável a descoberta da CROTOXINA, a primeira proteina tóxica do reino animal, obtida em forma cristalizada, suscitando a atenção do mundo científico.

Em 1938, a nova direção do Instituto Butantan, nomeada pelo Governo do Estado que encontrava-se sob intervenção federal, extinguiu a Seção de Química e demitiu sumariamente o Professor Slotta e o seu grupo de pesquisadores. Esta lamentável atitude, comandada por motivos políticos, certamente privou o Instituto Butantan e o País da oportunidade de ingressar, com toda força, na década de 50, no fabuloso campo dos hormônios, ilustrado pelas descobertas da cortisona e dos anticoncepcionais. Conseqüentemente, Karl Slotta se transferiu para o setor privado, tornando-se um dos fundadores da Endochimica S.A., empresa do ramo biofarmacêutico, na qual conseguiu desenvolver um núcleo de pesquisas básicas. Assim, na década de 50, publicou artigos científicos, principalmente nas *Memórias*, tratando de cromatografia, venenos de abelhas e fator hemolítico dos venenos ofídicos. O seu prestígio era de tal grandeza que a Universidade de

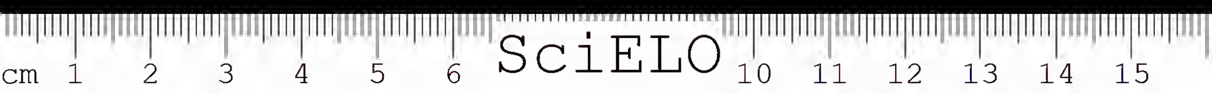
Miami o convidou, em 1957, para ocupar a cadeira de Bioquímica, onde permaneceu ativo até 1975.

Sem dúvida alguma, Karl Slotta pode ser considerado como o pai da Química dos Produtos Naturais no Brasil. Uma lista completa de suas publicações está sendo editada neste fascículo das *Memórias*, que tanto prestigiou e projetou nos compêndios da literatura científica mundial.

Raymond Zelnik
Diretor do Serviço de Química Orgânica
do Instituto Butantan

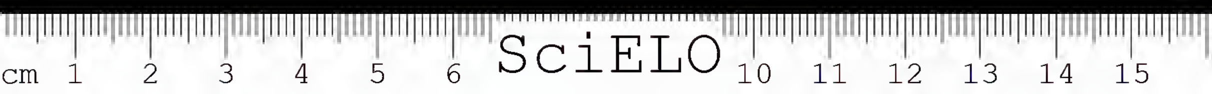
TRABALHOS PUBLICADOS
Karl Heinrich Slotta

1. BILTZ, H.; KRZIKALLA, H.; SLOTTA, K.H. 3,9-Dimethyl-5,7-isoharnsaeure, ihre Chloriertungsprodukte und ihr Abbau. *Ann. Chemie, 457*:131, 1927.
2. BILTZ, H. & SLOTTA, K.H. Ueber die Herstellung von Hydantoinen. *J. Prakt. Chem., 113(2)*:234, 1926.
3. FELS, E. & SLOTTA, K.H. Ueber das Hormon des Corpus luteum. In: CONGRESS FOR SEX RESEARCH, 2. London, 1930. *Proc.*
4. GINSBERG, N.J.; DAUER, M.; SLOTTA, K.H. Melittin used as a protective agent against X-irradiation. *Nature, 220*:1334, 1968.
5. HECHT, E & SLOTTA, K.H. The chemical nature of the lipid activator in blood coagulation. *Amer. J. clin. Path., 37*:126, 1962.
6. MICHL, H. & SLOTTA, K. H. Electrophoretic separation of plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta, 51*:617, 1961.
7. SLOTTA, K.H. Acerca do café. *O Estado de São Paulo*, S. Paulo, 08 mar. 1936, p. 5.
8. SLOTTA, K.H. Aquisições recentes sobre a insulina. *Rev. Med., 25*(93): 25, 1941.
9. SLOTTA, K. H. Beitrage zur Glukosid-Synthese. 1929. /Habilitationsschrift/.
10. SLOTTA, K.H. Bromcyan und wasserfreis Blausaeure. *Ber. dtsch. chem. Ges., 67*:1028, 1934.
11. SLOTTA, K.H. The cell growth-promoting factor II. *Ztschr. physiol. Chem., 361*:599, 1980.
12. SLOTTA, K.H. Chemistry and biochemistry of snake venoms. In: ZECHMEISTER, L. ed. *Progress in the chemistry of organic natural products*. Wien, Springer-Verlag, 1955. v. 12 p. 406.
13. SLOTTA, K.H. A crotoxina; primeira substância pura dos venenos ofídicos. *An. Acad. bras. Sci.*, 10(3): 195-209, 1938.
14. SLOTTA, K.H. Direct and indirect hemolytic factors from animal venoms. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL TOXINS. Atlantic City, N.Y., 1966. *Proc.* p. 369.
15. SLOTTA, K.H. Ein letztes Wort zur Geschlechtsvoraussage nach Luettge V. Mertz. *Ztbl. Gyn.*,: 3068, 1926.
16. SLOTTA, K.H. Estrutura química e efeito farmacológico. *Brasil-Médico, 87*:81, 1973.
17. SLOTTA, K.H. Estudo sobre os venenos de sapos brasileiros. II. Sobre a adrenalina no veneno do *Bufo marinus. Mem. Inst. Butantan, 11*:101, 1937.
18. SOTTA, K.H. Estudos químicos sobre venenos ofídicos. II. Sobre a forma de ligação do enxofre. *Mem. Inst. Butantan, 11*:121, 1937.
19. SLOTTA, K.H. Estudos químicos sobre venenos ofídicos. III. Teor da coagulação e da lecitinase. *Mem. Inst. Butantan, 11*:133, 1937.
20. SLOTTA, K.H. Further experiments on crotoxin. In: BUCKLEY, E.E. ed. *Venoms*. Washington, American Association for the Advancement of Science, 1956. p. 253-258.
21. SLOTTA, K.H. *Grundriss der Modernen Arzneistoff-Synthese*. Stuttgart, Ferd. Bnke, 1931, 202 p.
22. SLOTTA, K.H. Os hormonios sexuaes sob o ponto de vista chimico. *Rev. Obstet. Ginec. S. Paulo, 2*:261, 1938.
23. SLOTTA, K.H. *Hydantoine*. Breslau, Hochschulverlag, 1923. Dissertation/
24. SLOTTA, K.H. Increase of aldehydogenic brain lipids due to aging. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF GERONTOLOGY, 7. Viena, 1966. *Proc.* p. 125.
25. SLOTTA, K.H. Intervenção da chimica em favor dos cafés baixos. *Rev. Ouim. Ind. 6*:500, 1937.
26. SLOTTA, K.H. Iodierung und Nitrierung des Diphenyl aether-aldehyde (4). *Ber. dtsch. chem. Ges., 68*:2059, 1935.
27. SLOTTA, K.H. The isolation of progesterone. *Amer. J. Obstet. Gynec., 121*:428, 1975.
28. SLOTTA, K.H. Ist eine Geschlechtsvoraussage nach Luettge — v. Mertz-Sellheim moeglich? *Ztbl. Gyn.*: 1631, 1926.
29. SLOTTA, K.H. Do medicamento ao entorpecente. *Rev. bras. Farm., 22*:389, 1941.
30. SLOTTA, K.H. Messbombe fuer Leichtfluechtige Stoffe. *Angew. Chem., 40*:1341, 1927.



31. SLOTTA, K.H. Mitochondrial coenzyme Q10 in rats of various ages. *J. Gerontol., 20*:165, 1965.
32. SLOTTA, K.H. Mitochondrial phospholipids in rats of various ages. *J. Gerontol., 18*:326, 1963.
33. SLOTTA, K.H. Novas noções sobre o princípio antipernicioso do fígado. *An. Soc. Med. Cirurg. R. Janeiro*, 1940.
34. SLOTTA, K.H. Pesquisa e prática na hormoterapia. *Rev. Assoc. Med. M. Gerais, 1*:233, 1950.
35. SLOTTA, K.H. Phenyl-2-carbonsaeure-(4) des Phenols. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 68:2226, 1935.
36. SLOTTA, K.H. Phospholipases. In: BOYER, P.D. ed *The enzymes*. 1960. v. 4, p. 551.
37. SLOTTA, K.H. Das Plasminogen. Plasmin-System. *Saarlandische Aerzteblatt*, 10 out. 1963.
38. SLOTTA, K.H. Probleme der hormonchemie. *Angew. Chem., 40*:1465, 1927.
39. SLOTTA, K.H. Progesterone, 50 years ago. *Trends Biochem. Sci.*, 8:417, 1983.
40. SLOTTA, K.H. Da química do hormonio do corpo amarelo. *An. bras. Ginec., 11*, 1941.
41. SLOTTA, K.H. Os recentes progressos da vitaminologia. *Brasil-Médico, 51*:831, 1941.
42. SLOTTA, K.H. Schlangengifte. I. Bestimmung von Gift-Koagulase-und lecithinase-Wert und Beinflussung der Gifte durch physikalische and chemische Mittel. *Ber. dtsch. chem. Ges., 71*:258, 1938.
43. SLOTTA, K.H. Schlangengifte. II. Ueber die Bindungsart des Schwefels. *Ber. dtsch. chem. Ges., 71*:254, 1938.
44. SLOTTA, K.H. Das Schwangerschaftshormon. *Umschau, 38*:909, 1934.
45. SLOTTA, K.H. Schwangerschaftshormon I und II. *Ztschr. Physiol. Chem. 228*:207, 1934.
46. SLOTTA, K.H. Sobre a chimica dos hormonios sexuaes. *Rev. Brasil-Cirurg., 2*. 1940.
47. SLOTTA, K.H. Sobre a chimica dos hormonios sexuaes. *Rev. bras. Quim., 32*:632, 1938.
48. SLOTTA, K.H. Sobre a chimica dos hormonios sexuaes. I. Estado actual da questão. *Mem. Inst. Butantan, 11*:1, 1937.
49. SLOTTA, K.H. Sobre os hormonios proteicos. *An. bras. Ginec., 9*, 1940.
50. SLOTTA, K.H. Sobre insulina. *Selecta Quimica*, Dez. 1947.
51. SLOTTA, K.H. Synthese der Terephtal-und Isophtal-aldehyd-saeure-ester. *Ber. dtsch. chem. Ges., 71*:335, 1938.
52. SLOTTA, K. H. Synthesen thyroxin-aenlicher Substansen aus Diphenyl aether. *Ber. dtsch. chem. Ges., 69*:556, 1936.
53. SLOTTA, K.H. Thromboplastin. 1. Phospholipid moiety of thromboplastin. *Proc. Exp. Biol. Med., 103*:53, 1960.
54. SLOTTA, K.H. Ueber die Oxydation der Harnsaeure-glykols. *J. Prakt. Chem., 110* (2):264, 1925.
55. SLOTTA, K.H. Vorschlftflasche fuer Vakuumdestillationen. *Chemfa, 3*:183, 1930.
56. SLOTTA, K. H. Zur Chemie und Gewinnung des weiblichen Sexualhormons. *Dtsch. med. Wschr.*, (51), 1927.
57. SLOTTA, K.H. Zur Chemie der Schlangengifts. *Experientia, 9*:81, 1953.
58. SLOTTA, K.H. Zur Gewinnung von reinem Lecithin und Colaminkephalin mittels Dünnschicht-Chromatographie. *Mh. Chemie, 97*:1723. 1966.
59. SLOTTA, K.H. Zur Gewinnung von 3,4,5 — Trimethoxy-benzaldehyd. *J. Prakt. Chemie, 133*(2):226, 1932.
60. SLOTTA, K.H. Zur Synthese Sympathomimetisch wirkender Lokalanesthetica. *Ber. dtsch. chem. Ges., 71*:59, 1938.
61. SLOTTA, K.H. & ALTNER, W. Ueber B-Phenyl-aethylamine II. Mitteil: Eine neue Tyramin-Synthese. *Ber. dtsch. chem. Ges., 64*:1510, 1931.
62. SLOTTA, K.H. & BALLESTER, A. Determinação colorimétrica da hialuronidase dos venenos ofídicos. *Mem. Inst. Butantan, 26*:311, 1954.
63. SLOTTA, K.H. & BEHNISCH, R. Hydrocuprein-aminoalkyl-aether. *Ber. dtsch. chem. Ges., 68*: 754, 1935.
64. SLOTTA, K.H. & BEHNISCH, R. Umsetzung von primaeren und sekundaeren Amino-alkoholen und Amino-phenolen mit Arylsulfon-saeure-chroriden. *J. Prakt. Chemie., 133*(2):225, 1932.
65. SLOTTA, K.H. & BEHNISCH, R. Zur Alkylierung von Hydro-cuprein. *Ber. dtsch. chem. Ges., 66*:360, 1933.

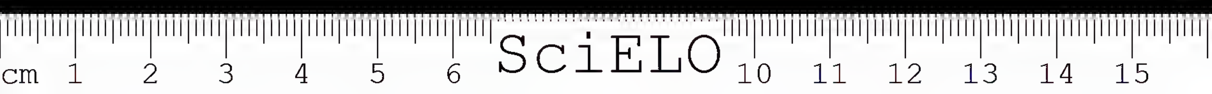
66. SLOTTA, K.H. & BEHNISCH, R. Zur Bildung des Piperazin-Ringes. *Ann. Chemie, 497*:170, 1932.
67. SLOTTA, K.H.; BEHNISCH, R.; SZYSZKA, G. Zur Synthese und Wirkung von Hydantoinen. *Ber. dtsch. chem. Ges., 67*:1529, 1934.
68. SLOTTA, K.H. & BLANKE, E. Zur Methodik der Mikrohydrierung. *J. Prakt. Chem., 143*(2):4, 1935.
69. SLOTTA, K.H. & BORCHERT, P. Histamina e toxinas protéicas no veneno de abelha. *Mem. Inst. Butantan, 26*:279, 1954.
70. SLOTTA, K.H. & BORCHERT, P. Sobre o fator hemolítico dos venenos ofídicos. *Mem. Inst. Butantan, 26*:297, 1954.
71. SLOTTA, K.H. & BRIL, S. Action of cancer serum on the oxydation of catechol. *Acta Un. int. Cancer, 12*(4) 1956.
72. SLOTTA, K.H.; BRIL, S.: BELLESTER, A. Der "Sog" in der Papierelektrophorese. *Ztschr. Physiol. chem., 296*:141, 1954.
73. SLOTTA, K.H.; BRIL, S.; FRANKENTHAL, L. Estudos bioquímicos sobre a formação de melanina na pele humana. *O Hospital, 43*:523, 1953.
74. SLOTTA, K.H. & DEUTSCH, E. Thromboplastic activity of split products of phosphatidyl ethanol-amine. *Thrombos. Diathes. haemorrh., 4*:283, 1960.
75. SLOTTA, K.H. & DRESSLER, H. Ueber Isocyanate. VII. Neuss Darstellungsverfahren fur aromatische Senfoele und Isocyanate. *Ber. dtsch chem. Ges., 63*:888, 1930.
76. SLOTTA, K.H. & FORSTER, V.W. Estudos químicos sobre venenos ofídicos. V. Determinação quantitativa dos componentes que contêm enxofre. *Mem. Inst. Butantan., 12*:513, 1938.
77. SLOTTA, K.H. & FORSTER, V.W. Sobre a chimica dos hormonios sexuaes. III. Constituição das substâncias estrogênicas obtidas com o anol. *Mem. Inst. Butantan, 11*:31, 1937.
78. SLOTTA, K.H. & FORSTER, V.W. Schlangengifte. IV. Quantitative Bestimmung der Schwefelhaltigen Bausteine. *Ber. dtsch. chem. Ges., 71*:1082, 1938.
79. SLOTTA, K.H.; FORSTER, V.W.; FRAENKEL-CONRAT, H.L. Schlangengifte. V. Ueber die Schwefelhaltigen Bausteine des Cobragiftes. *Ber. dtsch. chem. Ges., 71*:1623, 1938.
80. SLOTTA, K.H. & FRAENKEL-CONRAT, H.L. Crotoxin. *Nature, 144*:290, 1939.
81. SLOTTA, K.H. & FRAENKEL-CONRAT, H.L. Estudos chimicos sobre venenos ofídicos. IV. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan, 12*:505, 1938.
82. SLOTTA, K.H. & FRAENKEL-CONRAT, H.L. Schlangengifte. III. Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangengiftes. *Ber. dtsch. chem. Ges., 71*:1076, 1938.
83. SLOTTA, K.H. & FRAENKEL-CONRAT, H.L. Two active proteins from rattlesnake venom. *Nature, 142*:213, 1938.
84. SLOTTA, K.H. & FRANKE, W. Darstellun und Verwendung hoeherer Ester der p-Toluol-sulfonsaeure. *Ber. dtsch. chem. Ges., 63*:678, 1930.
85. SLOTTA, K.H. & FRANKE, W. Das Puffergemisch aus sek. Natriumphosphat und Citronensaeure. *Ber. dtsch. chem. Ges., 64*:452, 1931.
86. SLOTTA, K.H. & FRANKE, W. Zur Konstitution der Azo-Indicatoren. I. Mitteil: Naphthol-Orange. *Ber. dtsch. chem. Ges., 64*:86, 1931.
87. SLOTTA, K.H. & FRANKE. W. Zur Konstitution der Azo-Indicatoren. II. Mitteil: Die hoeheren Homologen dez Helianthins und des Methylrote. *Ber. dtsch. chem. Ges., 66*:104, 1933.
88. SLOTTA, K.H.; FRANKE, W.; HABERLAND, G. Zur Konstitution der Azo-Indicatoren. III. Mitteil: Die Alkylierung von Naphthol-Orange. *Ber. dtsch. chem. Ges., 66*:108, 1933.
89. SLOTTA, K.H. & GIMENEZ, D.R. Preparation of pure phospholipids by thin layer chromatography and their analysis. *Fed. Proc., 23*:(2), 1964.
90. SLOTTA, K.H.; GOLUB, A.L.; LOPEZ, V. The cell growth-promoting factor. *Ztschr. physiol. Chemie,* 356:367, 1975.
91. SLOTTA, K.H. & GONZALEZ, J.D. Fractionation of plaminogen by starch gel electrophoresis. *Thrombos. Diathes. haemorrh., 12*:126, 1964.
92. SLOTTA, K.H. &. GONZALEZ, J.D. Native and acid-treated plasminogen. *Fed. Proc., 22*(2), 1963.
93. SLOTTA, K.H. & GONZALEZ, J.D. Native plasminogen. *Biochemistry, 3*:285, 1964.
94. SLOTTA, K.H. & HABERLAND, G. Spasmolytica von Papaverintyp. *Angew. Chem., 46*:766, 1933.



95. SLOTTA, K.H. & HABERLAND, G. Zur mikro-analytischen Bestimmung von Methoxyl-und Methylimid-Gruppen. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *65*:127, 1932.
96. SLOTTA, K.H. & HABERLAND, G. Zur Gewinnuhg der Homopiperonylsaeure. *J. Prakt. Chem.*, *139*(2):211, 1933.
97. SLOTTA, K.H. & HAMBURGER, R. Zur "Buscaino-Reaktion". *Arch. Psychiatric*, *100*:516, 1933
98. SLOTTA, K.H. & HELLER, H. Ueber B-Phenyl-aethylamine. I. Mitteil: Mescalin und mescalin-aehnliche Substanzen. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *63*:3029, 1930.
99. SLOTTA, K.H. & HELLER, H. Versuche zur Glucosidierung von Phenyl-aethanolaminen. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *63*:1024, 1930.
100. SLOTTA, K.H. & JACOBI, K.R. Herstellung Organischer Reagenzien im Analytischen Laboratorium. I. Diphenyl-carbazid und Diphenyl-carbazon. *Ztschr. Analyt. Chemie*, *77*:344, 1929.
101. SLOTTA, K.H. & JACOBI, K.R. Herstellung Organischer Reagenzien im Analytischen Laboratorium. II. "Kupferron" (Ammoniumsalz des Nitrosophenylhydroxylamins). *Ztschr. analyt. Chemie.*, *80*:97, 1930.
102. SLOTTA, K.H. & JACOBI, K.R. Herstellung Organischer Reagenzien im Analytischen Laboratorium. III. Diacetyldioxim. *Ztschr. analyt. Chemie.*, *83*:1, 1931.
103. SLOTTA, K.H. & JACOBI, K.R. Ueber Organische Quecksilberbasen und ihre Salze. *J. Prakt. Chem.*, *120*(2):249, 1929.
104. SLOTTA, K.H. & LAUERSEN, F. 2-Nitro-homoveratrumsaure. *J. Prakt. Chem.*, *139*(2):220, 1934.
105. SLOTTA, K.H. & LORENZ, L. Ueber Isocyanate. I. Darstellung Aliphatischer Isocyanate. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *58*:1320, 1925.
106. SLOTTA, K.H.; MICHL, H.; SANTOS, B.G. Comparative studies on native and acid-treated plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta*, *58*:459, 1962.
107. SLOTTA, K.H. & MUELLER, J. Halbmikro-Verbrennung nach dem Kontaktverfahren. *Chemfa*, *7*:380, 1934.
108. SLOTTA, K.H. & MUELLER, J. Ueber dem Abbau des Mascalins und mascalinaehnlicher Stoffe in Organisms. *Phys. Chem.*, *238*:14, 1936.
109. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. O café sob o ponto de vista chimico. I. Determinação do extracto e da cafeina. *Mem. Inst. Butantan*, *11*:39, 1937.
110. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. O café sob o ponto de vista chimico. II. Alcaloides do café. *Mem. Inst. Butantan*, *11*:49, 1937.
111. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. O café sob o ponto de vista chimico. V. Três novas substâncias do café. *Mem. Inst. Butantan*, *11*:71, 1937.
112. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. O café sob o ponto de vista chimico. VII. Novo método para a determinação da trigonelina. *Mem. Inst. Butantan*, *12*:497, 1938/39.
113. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Estudo sobre os venenos de sapos brasileiros. I. Composição do veneno de *Bufo marinus*. *Mem. Inst. Butantan*, *11*:89, 1937.
114. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Zur Chemie des Kaffees. I. Eine neue Methode zur Bestimmung der Chlorogensaure. *Ber dtsch. chem. Ges.*, *71 B*: 1616, 1938.
115. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Zur Chemie des Kaffes. II. Eine neue Methode zur Bestimmung des Trigonellins. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *71B*:1987, 1938.
116. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Zur Chemie des Kaffees. III. Die Gewinnung von Cafesterol und anderen Verbindungen Aus dem Unverseifbaren des kaffee-Oels. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *71B*:1991, 1938.
117. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Zur Chemie des Kaffees. IV. Zur Konstitutionsaüfklarung des Cafesterols. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *71B*:2342, 1938.
118. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Zur Chemie des Kaffees. V. Neuere Analytische Erfahrungen. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *72B*: 126, 1938.
119. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Zur Chemie des Kaffees. VI. Ueber den Gehalt des Roh-und Rostkaffees an Trigonellin und Chlorogensaure. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *72B*:133, 1939.
120. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Ueber Oxidationen mit Hypojodit. I. Phenole., Neue Bestimmungsmethoden fuer Adrenalin und Tyroxin. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *71B*:1611, 1938.
121. SLOTTA, K.H. & NEISSER, K. Ueber Oxidationem mit Hypojodit. II. Stickstoffhaltige Heterocyclen. Neue Bestimmungemsthode des Aneurins (Vitamin B_1). *Ber. dtsch. chem. Ges.*, *71B*:1984, 1938.
122. SLOTTA, K.H.; NEISSER, K.; CARDEAL, A. O café sob o ponto de vista chimico. IV. Determinação e extracção do acido clorogênico do cafè. *Mem. Inst. Butantan.*, *11*:61, 1937.



123. SLOTTA, K.H.; NEISSER, K.; CARDEAL, A. O café sob o ponto de vista chimico. VI. Novo método para a determinação do acido clorogênico no café. *Mem. Inst. Butantan, 12*:487, 1938/39.
124. SLOTTA, K.H. & OLIVA, F. Estabilidade da vitamina B_1. *O Hospital, 38*:891, 1951.
125. SLOTTA, K.H. & POWERS, J.K. Determination of ethanolamine and serine. *Anal. Biochem., 4*:69, 1962.
126. SLOTTA, K.H. & PRIMOSIGH, J. The amino-acid composition of crotoxin. *Nature, 168*:696, 1951.
127. SLOTTA, K.H. & PRIMOSIGH, J. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. VI. Composição da crotoxina. *Mem. Inst. Butantan, 23*:51-62, 1951.
128. SLOTTA, K.H. & PRIMOSIGH, J. — A new method of quantitative paper chromatography. *Mem. Inst. Butantan, 24*(2):85-100, 1952.
129. SLOTTA, K.H. & RUSCHIG, H. Die Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum. *Klim. Wochenschrift, 13*:1207, 1934.
130. SLOTTA, K.H.; RUSCHIG, H.; FELS, E. Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum I. *Ber. dtsch. chem. Ges., 67*:1270, 1934
131. SLOTTA, K.H.; RUSCHIG, H. & FELS, E. Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum II. *Ber dtsch. chem. Ges., 67*:1624, 1934.
132. SLOTTA, K.H.; RUSCHIG, H.; BLANKE, E. Reindarstellung der Hormone aus dem Corpus luteum III. *Ber. dtsch. chem. Ges., 67*:1947, 1934.
133. SLOTTA, K.H.; RUSCHIG, H.; FELS, E. Ueber die Hormone des Corpus luteum. *Helv. chim. Acta, 17*:1381, 1934.
134. SLOTTA, K.H. & SZYSZKA, G. O café sob o ponto de vista chimico. III. Uso do café no preparo de sabão ou óleo comestível. *Mem. Inst. Butantan, 11*:55, 1937.
135. SLOTTA, K.H. & SZYSZKA, G. Estudos químicos sobre venenos ofídicos. I. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 11*:109, 1937.
136. SLOTTA, K.H & SZYSZKA, G. Instalação dos laboratórios de química para trabalhos de Seção de Pesquisas do Instituto do Café. *Rev. Inst. Café, 12*:1467, 1937.
137. SLOTTA, K.H.; SZYSZKA, G.; BLANKE, E. Sobre a química dos hormônios sexuais. II. Obtenção da estrona da urina de éguas prenhes. *Mem. Inst. Butantan, 11*:17, 1937.
138. SLOTTA, K.H. & SZYSZKA, G. Synthese des Mescalins. *Ber dtsch. chem. Ges., 67*:1106, 1934.
139. SLOTTA, K.H. & SZYSZKA, G. Ueber b-Phenyl — aethylamine. III. Mitteil: Neue Darstellung von Mescalin. *J. Prakt. Chemie., 137*(2):339, 1933.
140. SLOTTA, K.H. & SZYSZKA, G. Ueber b-Phynyl-aethylamine. IV. Darstellung von b — (Amino-phenyl) — aethylaminen. *Ber. dtsch. chem. Ges., 68*: 184, 1935.
141. SLOTTA, K.H. & TSCHESCHE, R. Ueber Biguanide. I. Zur Konstitution der Schwermetall-Komplexver — bindungen des Biguanids. *Ber. dtsch. chem. Ges., 62*:1390, 1929.
142. SLOTTA, K.H. & TSCHESCHE, R. Ueber Biguanide. II. Die blutzucker-senkende Wirkung der Biguanide. *Ber. dtsch. chem. Ges., 62*: 1398, 1929.
143. SLOTTA, K.H. & TSCHESCHE, R. Ueber Isocyanate. II. Umsetzungen des Methylisocyanates unter dem Einfluss von Triasethylphosphin. *Ber. dtsch. chem. Ges., 60*:295, 1927.
144. SLOTTA, K.H. & TSCHESCHE, R. Ueber Isocyanate. III. Das Symmetrie Prinzip bei der Bildung der Trimethylcyanursaure-ESTER. *Ber. dtsch. chem. Ges., 60*:301, 1927.
145. SLOTTA, K.H. & TSCHESCHE, R. Ueber Isocyanate. IV. Untersuchungen an 1, 3, 5 — Oxydiazinen. *Ber. dtsch. chem. Ges., 60*:1011, 1927.
146. SLOTTA, K.H. & TSCHESCHE, R. Ueber Isocuanate. V. Kondensation mit Methylisocyanat, im besonderen mit Blausaure. *Ber. dtsch. chem. Ges., 60*:1021, 1927.
147. SLOTTA, K.H. & TSCHESCHE, R. Ueber Isocyanate. VI. Kondensation von Methylisocyanat mit Cyanamid unter dem Einfluss von Triaethylphosphin. *Ber. dtsch. Chem. Ges., 62*:137, 1929.
148. SLOTTA, K.H.; TSCHESCHE, R.; DRESSLER, H. Ueber Guanyl-thioharnstoffe. *Ber. dtsch. chem. Ges., 63*:208, 1930.
149. SLOTTA, K.H. & VICK, J.A. Identification of the direct lytic factor from cobra venom as cardiotoxin. *Toxicon, 6*:167, 1969.



150. SLOTTA, K.H. & VICK, J.A.; GINSBERG, N.J. Enzymatic and toxic activity of phospholipase A. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL TOXINS. Tel-Aviv, 1970. *Proc.*

Lista fornecida pela Dra. *Maja Slotta*, a quem agradecemos.



Mem. Inst. Butantan
50(1):15-20, 1988.

SOBRE DOIS NOVOS MÉTODOS DE PREPARO DO HEMIPÊNIS DE SERPENTES

Paulo Roberto MANZANI*
Augusto Shinya ABE**

RESUMO: São apresentados dois métodos de preparo do hemipênis de serpentes, para preservação úmida e seca. O preparo para a preservação em meio úmido consiste no uso do ágar ou gel de amido, de fácil manuseio devido ao baixo ponto de fusão. O preparo do hemipênis seco mantém todas as características do orgão e é de grande durabilidade.
PALAVRAS-CHAVE: Hemipênis; Serpente; Técnica de preparo.

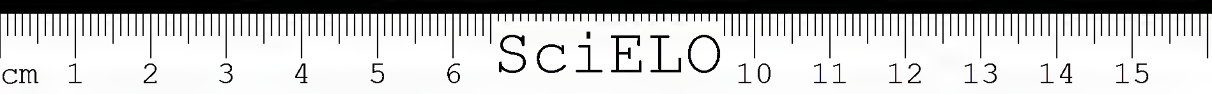
INTRODUÇÃO

Cope[2,3] foi pioneiro em utilizar a morfologia do hemipênis na classificação das serpentes. Posteriormente, Vellard[9,10] volta a discutir a importância dos caracteres fornecidos pelo hemipênis na classificação das serpentes. Uma resenha sobre os caracteres do hemipênis empregados na classificação, bem como a nomenclatura da morfologia do órgão e musculatura associada, pode ser vista em Dowling e Savage[5].

O hemipênis como fonte de caracteres para o agrupamento de serpentes foi questionado por vários autores, mas, como comenta Dowling[4], muito do descrédito teria como origem a preparação precária do hemipênis, que possibilitaria poucas conclusões em termos comparativos. A importância da condição de preparo do hemipênis de serpentes no estudo de sua morfologia foi recentemente ressaltada também por Branch[1]. Embora questionada por alguns autores, a configuração do hemipênis pode ser um dos poucos caracteres morfológicos aplicáveis na classificação de alguns grupos de serpentes, como as Xenodontinae do Novo Mundo, como enfatizam Jenner e Dowling[6].

A técnica utilizada por Cope consistia em dissecar o hemipênis e estendê-lo sobre uma prancheta. Uma outra forma de preparar o hemipê-

* Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 1170 — 13001 — Campinas-SP-Brasil.
** Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, C.P. 178 — 13500 — Rio Claro-SP-Brasil.



nis, consiste em injetar no órgão parafina liquefeita (Ortenburger[8]; Vellard[9]), álcool (Klauber[7]) ou látex líquido (Dowling e Savage[5]) preservando o órgão inflado.

O método ideal para a preservação de peça destinada a uma coleção deve implicar durabilidade e facilidade de preparo. É também importante que a peça permita o manuseio contínuo, sem que se deforme gradualmente ao longo do uso. Neste trabalho apresentamos duas técnicas de preparo e preservação do hemipênis de serpentes, por método de fácil execução, grande durabilidade e baixo custo.

MATERIAL E MÉTODOS

Após morta a serpente, faz-se uma incisão longitudinal na linha média, em serpentes com subcaudais simples, ou entre as subcaudais. A incisão deve ser superficial, cortando apenas a pele, que deve ser rebatida com uma pinça ou mesmo com os dedos, expondo uma camada de tecido muscular (*propulsor*), que reveste o músculo retrator do hemipênis (*retractor penis magnus*). Dissecado o *propulsor*, o músculo *retractor penis magnus* deve ser delicadamente puxado (Fig. 1A), para a localização da região apical invaginada do hemipênis. Essa região pode ser reconhecida pela coloração rosada, devido à vascularização, em contraste com o *retractor penis major*, que é mais claro. Procura-se, então, seccionar o *retractor penis major* em sua posição mais proximal, em relação ao hemipênis. Nesta operação deve-se certificar que o ápice do hemipênis não será amputado.

Uma vez seccionado o músculo retrator, procura-se evaginar o hemipênis com o auxílio de uma pinça de ponta romba ou por pressão com o dedo polegar, no sentido cauda-corpo. Ainda com o auxílio da pinça ou com os dedos, procura-se evaginar completamente o hemipênis, antes de tentar inflá-lo (Fig. 1B). Se o hemipênis for conservado em separado do corpo da serpente, pode ser seccionado nesta etapa. Após completamente evertido, procura-se introduzir uma agulha de ponta romba pela base do hemipênis e inflá-lo com ar, segurando sua base entre o polegar e o indicador. Ainda com o hemipênis cheio de ar, pode-se pressionar delicadamente o órgão entre os dedos, para que suas paredes se distendam completamente. Em alguns casos, o hemipênis não infla completamente, pois suas paredes não estão completamente distendidas. Com a leve pressão dos dedos, ao mesmo tempo que se injeta delicadamente o ar, o órgão vai lentamente tomando a sua forma. É importante que o hemipênis tenha sido previamente distendido com ar, antes de injetá-lo com o material definitivo (Fig. 1C).



MANZANI, P.R. & ABE, A.S. Sobre dois novos métodos de preparo do hemipênis de serpentes.
Mem. Inst. Butantan, 50(1):15-20, 1988.

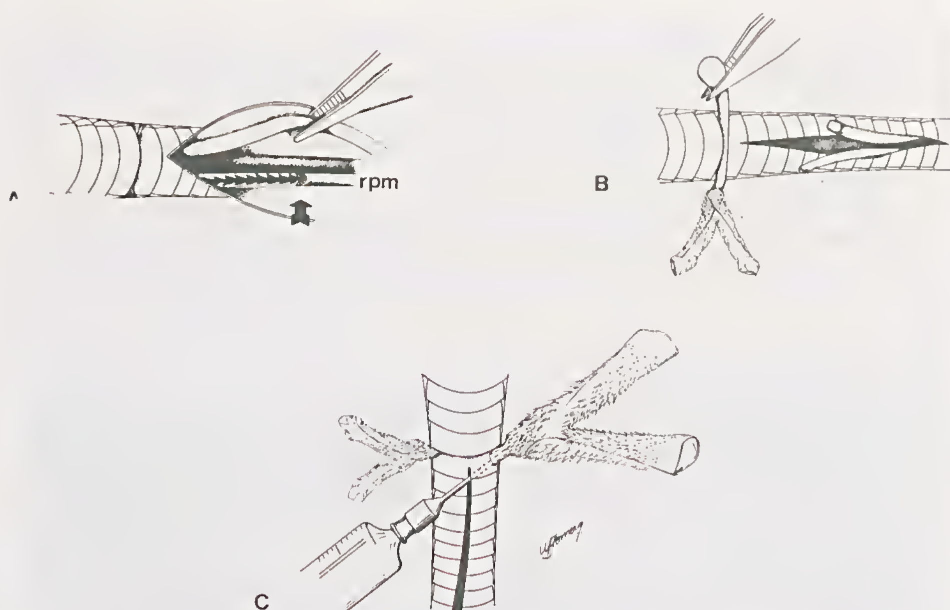


Fig. 1 — A. Exposição do músculo retrator do hemipênis (*retractor penis magnus*) esquerdo, para a localização da região apical do órgão. O hemipênis direito, invaginado, foi cortado longitudinalmente a partir do ponto de conexão com o *retractor penis magnus* (rpm), indicado pela seta.
B. Operação de evaginação do hemipênis, antes de inflá-lo com ar.
C. Distensão do hemipênis com ar, antes da injeção do material definitivo.

Após inflar completamente o hemipênis com ar, deve-se murchá-lo por compressão, se for destinado a preservação em meio líquido. Nesta fase é preciso cuidado, pois durante a compressão os espinhos basais do hemipênis podem perfurar a parede do órgão.

Para o preparo do material a ser preservado em meio líquido, uma vez retirado o ar do hemipênis, injeta-se ágar a 2,5 a 3% ou gel de amido a aproximadamente 14%. O ágar pode ser o de meio de cultura a ser desprezado, ligeiramente aferventado para se tornar mais consistente. A concentração do ágar, como a do amido, evidentemente dependem do tamanho do hemipênis a ser preparado, devendo ser mais consistentes às concentrações descritas, nas peças maiores, em que se injeta acima de três mililitros. Tanto o ágar como o gel de amido apresentam baixo ponto de fusão e demoram muito mais tempo a se solidificarem, permitindo a injeção cuidadosa do hemipênis, mesmo daqueles de espécies pequenas. Durante a injeção, segura-se a base do hemipênis para impedir o refluxo, como no caso do ar, quando se infla o órgão. Após a injeção do ágar ou gel de amido, amarra-se a base do hemipênis com uma linha forte, apertando-se o nó tão logo a agulha seja retirada. Para se acelerar a solidificação do ágar, a peça pode ser mergulhada em água com gelo fundente por alguns minutos. Solidificado o ágar, a preparação deve ser mergulhada em solução formalina a 10%, por algumas horas, para a fixação. Uma vez fixada a preparação, deve-se deixar em água por algumas horas para retirar o excesso de formol e preservá-la em álcool a 70%.

Quando em trabalhos de campo ou mesmo no laboratório, o hemipênis pode ser inflado com solução formalina a 5% a 7%, após a distensão das

paredes com injeção de ar. Neste caso, amarra-se a base do hemipênis com um nó falso. Posteriormente, a solução de formalina pode ser retirada por compressão, como no procedimento empregado para o ar. Em seguida, o órgão pode ser injetado com ágar. Desta forma, é possível preparar parcialmente a peça no campo e depois finalizá-la no laboratório ou quando se dispuser do ágar.

O hemipênis pode ainda ser preparado a seco, neste caso, obviamente em separado do corpo da serpente. O processo consiste, basicamente, em fazer passar um fluxo contínuo de ar através das paredes do órgão inflado que, ao secarem, permanecem na posição distendida. O procedimento é idêntico ao anterior, porém, o órgão deve permanecer inflado de ar. A seguir, introduz-se no hemipênis, na dependência do tamanho da peça a ser preparada, uma agulha de injeção ou bico descartável de pipetador conectado a uma cânula plástica de aerizador de aquário. Essa cânula deve ser conectada a uma fonte de ar de fluxo contínuo, como um compressor, saída de uma bomba de vácuo ou mesmo bomba de aquário, dependendo do tamanho do hemipênis. Neste processo, o ar deve ser injetado dentro do hemipênis e sair através das paredes, até a secagem completa do órgão. Em caso de um compressor ou bomba de vácuo, é muito importante conectar uma derivação reguladora de fluxo, como as utilizadas em aquários, para se manter uma saída de escape para o ar. O procedimento correto é fazer o ar sair por uma das aberturas da derivação e lentamente abrir e aumentar o fluxo para a cânula que serve o hemipênis, inflando-o cuidadosamente, sem forçar suas paredes. Uma vez controlado o fluxo de ar, aguarda-se a secagem do hemipênis. A pressão excessiva pode romper as paredes do hemipênis. Com hemipênis formolizados também é possível montar a peça a seco, bastando retirar a solução de seu interior antes de injetar o ar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os hemipênis preparados segundo as técnicas acima descritas têm-se mantido inalterados por vários anos, mesmo as peças secas, no caso acondicionadas em frascos ou recipientes de plástico, sem o emprego de substâncias higroscópicas ou antimofo. Em locais de elevada umidade relativa, no entanto, um cuidado maior seria recomendável, como aquele dispensado para material fotográfico, por exemplo, sílica gel no frasco com hemipênis.

As preparações com ágar ou gel de amido são de fácil montagem e não apresentam os inconvenientes da parafina ou cera de abelha utilizadas por Ortenburger[8] e Vellard[9]. Como esses materiais têm o ponto de fusão muito elevado, solidificam-se rapidamente dentro da agulha ou em contato com o tecido do hemipênis, dificultando a operação. Por outro lado, em caso de se empregar agulha de grosso calibre, quando possível, a parafina ou cera quente podem danificar as paredes delicadas do hemipênis, pela temperatura excessivamente elevada. Disto resultam hemipênis incompletamente inflados, que podem levar a interpretações errôneas de sua morfologia (Branch,[1]). Assim, os trabalhos de Vellard[9,10] ilustram o hemipênis de uma série de espécies, como por exemplo o de *Spilotes pullatus, Constrictor constrictor* (sic), *Philodryas schotti* (sic) e *P. olfersii*, parcialmente inflados, que são bem diferentes dos órgãos adequadamente preparados.



São descritas na literatura algumas preparações de hemipênis injetados com álcool etílico (Klauber, [7]) ou mesmo glicerina. Todavia, as paredes do hemipênis não são completamente impermeáveis a essas substâncias e, com o tempo, a preparação tende a murchar. Especialmente no caso da glicerina, que é solúvel em álcool a 70%, tende a se difundir para a solução em pouco tempo. A temperatura do álcool dos frascos pode-se elevar quando a coleção é mantida em recinto sem muito isolamento térmico. Nessas condições, a glicerina tende a se difundir ainda com mais rapidez. Todavia, o ágar e o gel de amido, além de terem o ponto de fusão mais elevado que a temperatura que normalmente atinge o álcool nas condições descritas, não se difundem pela parede do hemipênis.

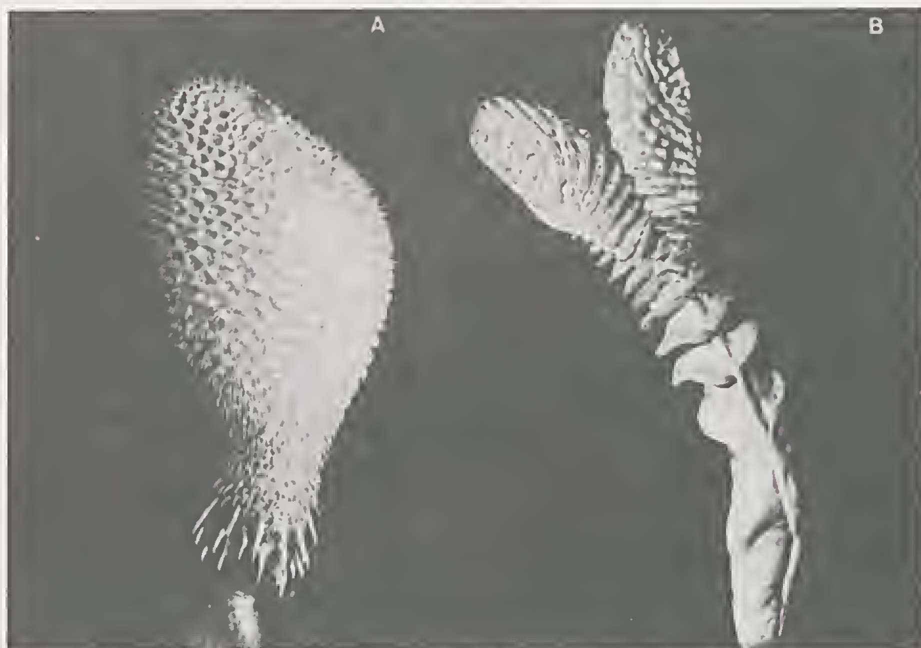


Fig. 2 — Preparação seca do hemipênis de *Mastigodryas bifossatus* (A) e *Boa c. amarali* (B). Notar como as pregas e microornamentação do ápice se mantém inalteradas.

As preparações a seco não se deformam com o tempo e mantêm todas as características morfológicas, como os espinhos, pregas e microornamentação do ápice (Fig. 2A e 2B). Essa preparação é apropriada para o exame em estereomicroscópio ou talvez microscópio de varredura, sendo assim possível examinar a microornamentação do ápice, sem o risco de ressecamento e eventual deformação, como ocorre com as peças preservadas em álcool. O único inconveniente do hemipênis preservado a seco é a deformação por compressão mecânica. No entanto, como peça delicada, deve ser acondicionada e manuseada com cuidado, o mesmo que se dedica a um crânio, por exemplo.

ABSTRACT: Two new methods for preparing snake hemipenis for liquid and dry collection are described. For liquid preservation hemipenis are filled with either agar or starch gell which are convenient due to low melting point and easy handling. The dry method keeps all structures of the hemipenis unchanged and is a long lasting preparation.
KEYWORDS: Hemipenis, Snake, Preparing technique.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRANCH, W.R. Hemipenial morphology of african snakes: A taxonomic review. Part 1. Scolecophidia and Boidae. *J. Herpetol., 20:* 285-99, 1986.
2. COPE, E.D. Classification of snakes. *Amer. Nat., 28:* 831-844, 1894.
3. COPE, E.D. The classification of the Ophidia. *Trans. Amer. Phil. Soc., 28:* 186-219, 1895.
4. DOWLING, H.G. The hemipenis of *Philodryas* Günther: a correction (Serpentes, Colubridae). *Amer. Mus. Novitates* (2375): 1-6, 1969.
5. DOWLING, H.G. & SAVAGE, J.M. A guide to the snake hemipenis: a survey of basic structure and systematics characteristics. *Zoologica, 45:* 17-28, 1960.
6. JENNER, J.V. & DOWLING, H.G. Taxonomy of American Xenodontine snake: the tribe Pseudoboini. *Herpetologica, 41:* 161-72, 1985.
7. KLAUBER, L.M. *Rattlesnakes. Their habits, life histories, and influence on mankind.* 2 ed. Berkeley, Univ. Calif. Press, 1972. 1533 p.
8. ORTENBURGER, A.I. A method of preparing reptile penes. *Copeia,*: 71-3, 1923.
9. VELLARD, J. Importance des caractères fournis par l'hemipenis pour la classification des ophidiens. *Bull. Soc. Zool. France, 53:* 406-18, 1928.
10. VELLARD, J. Morfologia del hemipenis y evolución de los ofidios. *Acta Zool. Lilloana, 3:* 263-88, 1946.

Recebido para publicação em 26/5/1987 e aceito em 17/11/1987.



Mem. Inst. Butantan
50(1):21-27, 1988.

SORO ANTI-RÁBICO HETERÓLOGO DE USO HUMANO. ANTICORPOS INESPECÍFICOS*

Hisako Gondo HIGASHI**
Josefina Farina MORAIS**
Rosalvo GUIDOLIN**
José Roberto MARCELINO**
Valéria Maria Pinheiro DI SALVIO**

RESUMO: O soro anti-rábico heterólogo de uso humano é constituído de imunoglobulinas, que podem ser obtidas do plasma de eqüídeos hiperimunizados com suspensão de cérebros de coelhos infectados com o vírus rábico fixo. As imunoglobulinas são purificadas e concentradas por digestão péptica. Entre as provas efetuadas para a liberação do produto encontra-se a de pirogenicidade, avaliada pela inoculação do soro por via intravenosa em coelhos. Durante a execução desta prova tem-se verificado, em algumas partidas, a morte súbita de coelhos. Pela técnica de imunodifusão dupla anticorpos antitecido nervoso, anti-soro e de antimaterial extraído de hemácias de coelhos, foram detectados no plasma e também no soro purificado e concentrado, levando os autores à conclusão de que as mortes dos coelhos estariam ligadas à presença desses anticorpos inespecíficos. Face aos resultados e para a validação dos testes de pirogenicidade, recomendam que a hiperimunização dos animais produtores seja feita, preferencialmente, com vírus rábico desenvolvido em cultivos celulares.
PALAVRAS-CHAVE: Soro anti-rábico; Anticorpos inespecíficos; Pirogenicidade.

INTRODUÇÃO

O soro anti-rábico heterólogo de uso humano é, geralmente, obtido a partir do plasma de cavalos ou muares[3, 6, 9, 8] hiperimunizados com suspensões de vírus rábico, purificado e concentrado, segundo a técnica de digestão péptica[7]. A suspensão imunogênica, da maior parte dos produtores, é constituída de triturado de cérebro de animais (coelhos, camundongos, carneiros), infectados intracerebralmente com amostras de vírus fixo. O te-

*Trabalho apresentado no XIV Congresso Brasileiro de Microbiologia — Viçosa — MG — Brasil, 1987.
**Instituto Butantan — Seção de Concentração e Fracionamento de Soros — C.P.65 — CEP.: 01051 — São Paulo — Brasil.

cido cerebral homogeneizado em presença de solução salina é inoculado por via subcutânea, em doses crescentes, nos cavalos ou muares. Alguns produtores de soro utilizam o cérebo de coelhos para a hiperimunização, face ao rendimento de material, ótima adaptabilidade do vírus ao sistema nervoso central desses animais e, ainda, pelas facilidades de manuseio dos coelhos em laboratório.

Após o processamento este soro é submetido às diversas provas químicas e biológicas exigidas[4], entre as quais encontra-se a detecção de pirogênio. A pirogenicidade é avaliada pela leitura da elevação de temperatura dos animais inoculados por via intravenosa com o soro anti-rábico.

Algumas partidas produzidas nessas condições têm causado mortes de coelhos por "choque" imediatamente após a sua inoculação. Suspeitou-se que essas mortes estivessem ligadas à presença de anticorpos inespecíficos, tais como os de: antitecido nervoso, anti-soro e o de anti-material de hemácias, todos eles induzidos pela inoculação de material de coelhos. Assim, estudou-se a presença desses anticorpos no plasma e nos soros derivados de cavalos hiperimunizados com suspensões de tecido cerebral de coelhos, infectados com o vírus rábico fixo. Como contraprova os mesmos testes foram efetuados com plasma e soro derivados de eqüínos hiperimunizados com vírus fixo replicado em cultivo celular.

MATERIAL E MÉTODOS

1 — *Plasmas hiperimunes*

Foram obtidos de cavalos pela inoculação subcutânea de doses de dois tipos diferentes de antígenos:

1.1 — com suspensão a 10% p/V em água bidistilada, de cérebros de coelhos infectados com a amostra PV1 de vírus fixo.

1.2 — com suspensão de vírus fixo, amostra PV, replicado em cultivo de células BHK[5].

Os animais foram sangrados sete dias após a 3.ª dose semanal de antígenos e o sangue recebido em recipientes contendo solução esterilizada de citrato de sódio a 1,7% em relação ao sangue. Após 24 horas a 4-5°C o plasma foi separado por sifonagem e adicionado de 0,3% de fenol (mistura éter-fenol a 50%).

2 — *Processamento dos plasmas*

Foi utilizado o método de digestão enzimática[7], diálise durante 48 horas em água corrente a 7°C e; finalmente, o soro concentrado foi isotonizado com cloreto de sódio p.a. e recebeu como conservante 0,3% de fenol.

3 — *Doseamento dos plasmas e soros purificados*

Os títulos foram obtidos pela técica soro-vírus neutralização[1] e expressos em Unidades Internacionais frente a um Soro Padrão fornecido pelo CEPANZO, ARGENTINA.

4 — *Detecção de anticorpos inespecíficos*

Pela técnica de imunodifusão dupla em gel de ágar, sobre lâminas de microscopia.

4.1 — preparação das lâminas: lâminas de microscopia, lavadas com solução sulfocrômica, recobertas com 1 ml de solução de Bacto Ágar Difco a 1% em água destilada. As lâminas eram mantidas em estufa a 37°C até a secagem completa da primeira camada de ágar. No momento do uso recebiam uma segunda camada de 3ml de solução do mesmo ágar, dissolvido em solução salina contendo 1/10.000 de timerosal. Após a solidificação do ágar, com perfuradores de 3mm de diâmetro interno, foram feitos os orifícios, dispostos quadrangularmente.

5 — *Preparação dos antígenos reagentes de coelhos normais e sadios*

5.1 — *Tecido cerebral*

O cérebro era triturado na proporção de 10% p/V em solução salina. O material centrigufado até obtenção de sobrenadante límpido era mantido a -20°C até o momento do uso.

5.2 — *Hemácias*

Obtidas por punção cardíaca com seringa e agulha lavadas com solução de heparina (5000 UI/ml) eram lavadas quatro vezes com solução salina. A um ml da papa de hemácias eram adicionados três ml de água destilada para a lise dos eritrócitos. O material era centrifugado para a eliminação dos detritos celulares, diluído a 1:50 em solução salina e armazenado a -20°C até o momento do uso.

5.3 — *Soro*

Obtido de sangue extraído por punção cardíaca, após a coagulação e separação a 4-5°C.

5.4 — *Tratamento dos soros com tecido cerebral de coelho normal.*

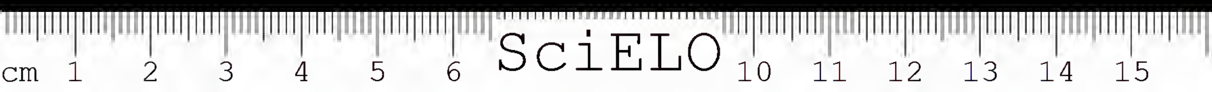
O tecido cerebral foi triturado em gral até obtenção de pasta uniforme. O soro anti-rábico concentrado foi tratado com 40% p/V de tecido, a 37°C, durante 2 horas, com agitação a cada 15 min. e a mistura centrifugada a 4000 rpm para eliminação do tecido em suspensão.

6 - *Testes de imunodifusão dupla*

Após a deposição dos antígenos nos orifícios centrais e dos anticorpos nos externos, as lâminas eram colocadas em câmara umidecida, durante 48 horas.

7 — *Coloração das lâminas*

As lâminas eram lavadas por imersão em solução salina durante três dias, envolvidas em papel de filtro umidecido com água destilada, e coloca-



das em estufa a 60°C até a secagem do papel. Em seguida lavadas em água corrente e o ágar dessecado a 60°C. A coloração era obtida com solução a 4% p/V de amido Schwarz em ácido acético, em seguida lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente.

RESULTADOS

Na Tab. 1 estão agrupados os resultados obtidos nas reações de precipitação antígeno-anticorpo por imunodifusão dupla em gel de ágar, com diferentes lotes de plasmas e soros concentrados, anti-rábicos e um controle negativo com soro antibotrópico concentrado.

A Tab. 2 demonstra o desaparecimento de anticorpos antitecido cerebral em soros positivos, após adsorção com tecido nervoso de coelho normal.

Imunodifusão dupla com diferentes lotes de plasmas e soros concentrados, frente a tecido cerebral, soro e material extraído de hemácias, de coelhos normais.

TABELA 1

Prod. Analisado	Testes de Imunodifusão dupla - n.° lotes/ positivos.		
	Tecido cerebral coelho normal.	Soro normal coelho normal	Material extraído de hemácias coelho normal
Plasma de cavalos hiperimunizados c/suspensão Vírus/ Tecido cerebral.	4/4	4/4	1/1
Plasma de cavalo hiperimunizado c/suspensão de Vírus/ Cultivo celular.	0/1	0/1	0/1
Soro concentrado de cavalos hiperimunizados c/suspensão Vírus/ Tecido cerebral.	11/11	11/11	3/3
Soro concentrado de cavalos hiperimunizados c/suspensão Vírus Cultivo celular.	0/1	0/1	0/1
Soro concentrado antibotrópico*	0/2	0/2	0/2

*Controle negativo

Imunodifusão dupla. Absorção de anticorpos antitecido cerebral de soro positivo com 40% p/v de tecido cerebral de coelho normal.

TABELA 2

Plasma e Soros anti-rábico	Tempo de Incubação 37°C	Resultado
Soro anti-rábico R. 1.86.06	150 minutos	Negativo
Soro anti-rábico R. 7.84.103	150 minutos	Negativo
Soro anti-rábico R. 2.85.20	120 minutos	Negativo
Soro anti-rábico R. 6.1.85	120 minutos	Negativo
Soro anti-rábico R. 86-09-90	120 minutos	Negativo
Soro anti-rábico R. 1-86-06 Não tratado com tecido cerebral.	—	Positivo

DISCUSSÃO

Pela análise da Tab. 1, segundo a metodologia aplicada, verifica-se que houve indução à formação de anticorpos antitecido cerebral, soro e material extraído de hemácias de coelhos normais, quando os cavalos eram hiperimunizados com vírus rábico fixo replicado em cérebro de coelhos.

Através da reação de imunodifusão dupla verificou-se que o tratamento dos soros positivos com uma suspensão de tecido cerebral de coelho normal, como demonstra a Tab. 2, foi eficaz, através de reação antígeno-anticorpo, na eliminação total dos anticorpos antitecido cerebral.

Nestas condições, os plasmas e os soros concentrados, anti-rábicos, obtidos pela hiperimunização de animais com antígenos rábicos oriundos de tecido cerebral de coelhos, não podem ser testados pela inoculação em coelhos, como é o caso da prova para detecção de pirogênio, sem o risco de incorrer em falsos resultados. Algumas inoculações intravenosas em coelhos, de soros anti-rábicos purificados, por ocasião de prova de pirogenicidade exigida, determinaram a morte desses animais ao cabo de minutos. Acredita-se que o fenômeno com início e evolução tão rápidos característico de "choque", tenha ocorrido segundo uma reação mediada por anticorpos, principalmente por aqueles de anti-soro de coelhos que, de acordo com as provas de imunodifusão, estavam presentes no soro. Reações dessa natureza não foram observadas com o soro de animais hiperimunizados com antígenos rábicos derivados de cultivo celular, bem como não ocorreram também, obviamente, com o soro antibotrópico usado como padrão negativo.

HIGASHI, H.G.; MORAIS, J.F.; GUIDOLIN, R.; MARCELINO, J.R.; DI SALVIO, V.M P. Soro anti rábico heterólogo de uso humano. Anticorpos inespecíficos. Mem. Inst. Butantan, 50(1):21-27, 1988.

CONCLUSÕES

1 — No plasma e no soro anti-rábico purificado e concentrado, de cavalos hiperimunizados com suspensão de tecido cerebral infectado com o vírus rábico fixo ocorrem, além do anticorpo rábico específico, anticorpos anti-tecido cerebral, anti-soro e anti-material extraído de hemácias de coelhos normais.

2 — A inoculação endovenosa desse soro em coelhos inviabiliza o teste para detecção de substâncias pirogênicas porque pode levar o animal à morte face a ocorrência de choque imediato, mediado pela presença de anticorpos anti proteínas de coelhos (tecido cerebral, soro sangüíneo, materiais contidos nas hemácias);

3 — Para evitar a ocorrência das reações indesejáveis mencionadas, recomenda-se a utilização de antígenos rábicos mais puros como, por exemplo, aqueles obtidos pela replicação do vírus em cultivos celulares apropriados.*

ABSTRACT: The heterogeneous anti-rabies serum for humam use is constituted of imunoglobulins that can be obtained from plasma of equines hyperimmunized with rabbit brain suspension fixed rabies virus infected. The immunoglobulins are purified and concentrated by pepsin digestion. Among the tests for product releasing the pyrogenicity test is made by intravenously serum inoculation in rabbits and some suddenly rabbits dead was observed. By double immunodifusion technique, antibodies against brain, serum and material extracted from erythrocytes, of normal rabbits were founded in plasma and in concentrated serum. The authors concluded that rabbit on death can be related to the inespecific antibodies present in the serum. Based on these results, in order to validate the pyrogen test, the author advise that producer horses should be hyperimmunized with rabies virus developed in cell culture.
KEYWORDS: Anti-rabies serum; Inespecific antibodies; Pyrogenicity.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Silvio de Jesus pelo auxílio técnico prestado durante o desenvolvimento do trabalho e ao Sr. Ademir Pires pela manutenção dos animais utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATANASIU, P. Quantitative assay and potency test of anti-rabies serum and immunoglobulin of animal: method used in USSR. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, G. H. ed. *Laboratory Techniques in Rabies*. 3. ed. Geneva, WHO, 1973. p. 314.
2. CROWLE, A.J. Immunodifusion. New York, Academic Press, 1961.
3. D'ANTONA, D. G. & FALCHETTI, E. La production du serum antirabique chez cheval. In: CONGRESSO INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA, 6., Roma, 1953. *Atti* Roma, 1953. V.3. Sez. 8. p. 319 — 21.
4. FARMACOPÈIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo, Gráfica Siqueira, 1959.
5. GUIDOLIN, R.; BALTAZAR, M.G.G.; ZELANTE, F. Produção da vacina anti-rábica veterinária em suspensão de células BHK. Rev. Microbiol, 14(1):27-35, 1983.
6. LEPINE, P.G. & ATANASIU, P. Production of anti-rabies serum of animal origin. In: KAPLAN, M.M. & KOPROWSKI, G. H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 3. ed. Geneva, WHO, 1973. p. 299.

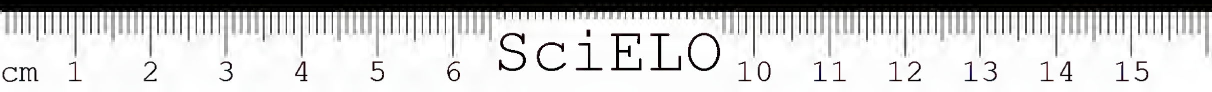
*O soro anti-rábico heterólogo produzido pelo Instituto Butantan vem sendo preparado pela imunização de cavalos com cultivos celulares infectados com vírus rábico fixo.



HIGASHI, H.G.; MORAIS, J.F.; GUIDOLIN, R.; MARCELINO, J.R.; DI SALVIO, V.M P. Soro anti-rábico heterólogo de uso humano. Anticorpos inespecíficos. Mem. Inst. Butantan, 50(1):21-27, 1988.

7. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD — Manual de procedimentos; produccion y pruebas de control en la preparacion de antisueros diftérico, tetânico, botulínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa. Ed. rev. Washington, OPS, 1977. p. 104 — 41.
8. MIRCHAMSY, H. — Sur la preparation et la concentration du serum antirabique in Iran. *Arch. Inst. Razi.* (15): 83-116, 1963.
9. SELIMOV, M. G.; GORDIENKO, E. Preparation of anti-rabies immunoglobulin of animal origin. In: KAPLAN, M. M. & KOPROWSKI, G. H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 3. ed. Geneva, WHO, 1973. p. 304.

Recebido para publicação em 19/10/1987 e aceito em 17/12/1987.




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
50(1):29-35, 1988.

INFLUÊNCIAS SAZONAL E DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO, TOXICIDADE DO VENENO E SOBREVIDA DE *BOTHROPS JARARACA* (WIED, 1824)

Elisabete Gomes Jardim VIEIRA
Raymundo ROLIM-ROSA
Hideyo IIZUKA
Maria de Fátima Domingues FURTADO
Wilson FERNANDES

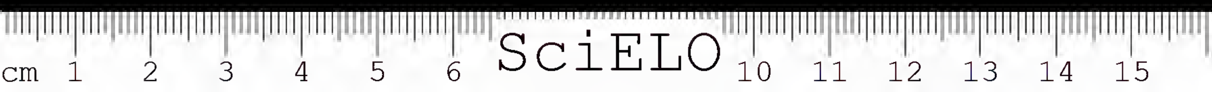
RESUMO: Foram utilizadas, no presente trabalho, 240 serpentes da espécie *Bothrops jararaca:* 120 animais foram estudados durante o inverno e 120, durante o verão. Estes grupos foram submetidos a diferentes tratamentos: 60 serpentes tiveram seus venenos extraídos, numa seqüência de quatro operações, pelo processo elétrico, e 60, em igual número de extrações, pelo processo manual, no inverno. Outro grupo de 120 ofídios foram submetidos ao mesmo procedimento, porém no verão.
Verificaram que as maiores porcentagens de mortes após quatro extrações foram registradas no inverno pelo processo elétrico (35,59%). Quanto à produção de veneno, foi constatado que o maior rendimento ocorre no verão pelo processo manual. A toxicidade foi aferida através da determinação de DL50 em camundongos inoculados pela via intraperitoneal.
PALAVRAS-CHAVE: *Bothrops jararaca-veneno; Toxicidade, produção. Influências sazonais.*

INTRODUÇÃO

No Brasil, o maior número de acidentes ofídicos ocorre durante os meses quentes do ano, isto é, de novembro a abril e, em menor número, de maio a outubro, de acordo com Rosenfeld[14].

De um total de 2.709 casos, devidamente identificados e atendidos pelo Hospital Vital Brasil, do Instituto Butantan, durante o período compreendido entre os anos de 1966 e 1977, cerca de 90% dos envenenamentos foram causados por ofídios do gênero *Bothrops.* Conforme constam nos registros do referido hospital, 40% dos acidentes foram provocados por *B. jararaca,* o que bem demonstra a relevância do estudo dessa espécie e de seu veneno[4].

Endereço para correspondência: CEP 01051 — Caixa Postal 65 — São Paulo — SP — Brasil.



Schenberg e cols[15] trabalhando com grupos de jararacas extraídas manualmente em intervalos variáveis, encontraram variações de diversos componentes do veneno após a primeira extração. Todavia, a atividade coagulante em relação ao seu volume mantinha-se normal enquanto que a atividade coagulante específica era aumentada em 100%.

Alguns autores já demonstraram a influência da sazonalidade sobre a composição dos venenos ofídicos. Gubencek e cols[9], analisando a peçonha de *Vipera ammondytes*, a mais comum e perigosa serpente do sul europeu, verificaram evidente variação de seus componentes, durante os meses de verão e de inverno. Bertrand e col. [3] já haviam encontrado diferenças sazonais de toxicidade no veneno de vípera.

Embora o Instituto Butantan utilize um "pool" de veneno de várias espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, para a produção industrial dos soros antibotrópico e antiofídico polivalente (fração botrópica) a sua titulação é realizada, conforme preceitua a Farmacopéia Brasileira[5], somente frente ao veneno de *Bothrops jararaca*. A quantidade de exemplares de serpentes *B. jararaca* mantidos na Seção de Venenos do Instituto Butantan é em torno de 40%, em relação ao total de serpentes peçonhentas.

Considerando todas essas observações foi que nos propusemos estudar a peçonha de jararaca quanto à sua produção, oscilação do seu grau de toxicidade, bem como número de mortes de exemplares, correlacionando-os com possíveis processos de extração e de influências sazonais.

MATERIAL E MÉTODOS

Serpentes utilizadas — Foram utilizados dois grupos de 120 exemplares de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) recebidas pela Seção de Venenos do Instituto Butantan, sendo um, durante o mês de dezembro — verão — e, outro, durante o mês de junho — inverno. As serpentes foram confinadas em gaiolas individuais, tendo sido controlada a produção do veneno obtido a cada extração, e o número de mortes verificado durante o experimento. Os répteis foram alimentados com camundongos em intervalos de 21 dias, e a água era fornecida "ad libitum" em um recipiente de barro, que serve tanto para o animal quanto para a manutenção da umidade do microclima. A temperatura média do ambiente oscilava entre os valores de 18 a 22°C no inverno, e de 23 a 25°C no verão.

Extrações de veneno — As extrações eram efetuadas regularmente a cada período de 21 dias. Um lote de 60 jararacas recebidas no verão mais 60 recebidas no inverno, foram extraídas pelo processo manual; enquanto que 60 outras recebidas no verão, mais 60 recebidas no inverno, foram extraídas mediante desgarga elétrica de 4 Volts, aplicada sobre o pálato[2].

O veneno foi colhido em cálice, centrifugado e imediatamente após, submetido à dessecação a vácuo e conservado a 4°C logo após ter sido convenientemente pesado em balança analítica.

Soluções de Veneno — O veneno seco, na concentração final dos 400 microgramos por mililitros, era dissolvido em solução fisiológica a 0,85% de NaCl,PA. Estas soluções eram distribuídas em flaconetes, os quais, uma vez hermeticamente fechados, eram conservados em congelador a -25°C, conforme técnica adotada por Furlanetto[7].

No momento da manipulação, ao proceder o preparo das doses necessárias para a determinação da DL50, cada frasco era descongelado, obser-



vando a mesma técnica empregada por Rolim-Rosa, R. et al[13] e Bancher[1].
Animais Utilizados — Todos os ensaios para a determinação da DL50, foram realizados em camundongos de 18 a 22 gramas de peso, sem distinção de sexo, fornecidos pelo Biotério Geral do Instituto Butantan. As inoculações eram feitas pela via intraperitoneal[16].
Cálculo da DL50 — A DL50 de cada teste foi sempre calculada com os resultados verificados após 24 e 48 horas das inoculações, pelo método de Reed & Muench[12] e ratificada pelo método prático preconizado por Miller & Tainter[11], em papel milimetrado em escala "log-probit".
Método estatístico — Para a análise estatística das médias independentes, foi aplicado o teste "t" ao nível crítico de 5%[17].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quantitativos e percentuais representados pela Tabela 1, referentes a mortes de exemplares de *B.jararaca* extraídas pelos processos manual e elétrico, no inverno e no verão, revelam que as operações efetuadas durante os meses frios causaram maior número de vítimas que nos meses quentes, principalmente quando elas são efetivadas mediante descarga elétrica, aliás fato também comprovado em trabalho anterior[13] em relação a *Crotalus durissus terrificus* e *C.d. collineatus*.

Nesta observação, não foi verificada apreciável diferença no número de baixas de exemplares da espécie em estudo entre os processos aplicados para a obtenção de peçonha, posto que foram registrados percentuais de 11,67 no elétrico e 13,33 no manual, no verão, e 35,59% e 28,33%, no inverno, respectivamente, fenômenos ligados, evidentemente, ao metabolismo de animais pecilotermos.

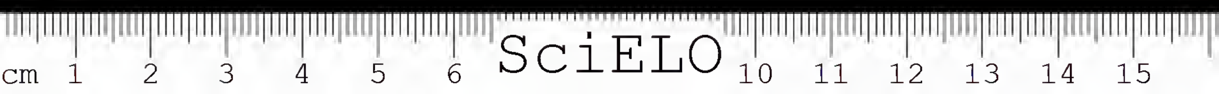
A extração elétrica efetuada no inverno partiu de 59 exemplares ao invés de 60, uma vez que um morrera antes da primeira operação, como consta na Tabela 1.

Conforme registra a Tabela 2, o processo de extração elétrico foi, embora com pequena diferença, mais produtivo que o manual durante o inverno.

Constata-se, ainda pela Tabela 2, que as extrações realizadas por ambos os processos, elétrico e manual, tendem a diminuir a produção média por exemplar, de um modo geral, a partir da primeira operação, com exceção da 4.ª manual. Nota-se, também, que a primeira extração elétrica foi aquela que apresentou o maior rendimento, 47,99 mg, a qual por apresentar a que seria a carga presumível de veneno das glândulas veneníferas de serpentes ainda não alimentadas em cativeiro, seria o produto representativo da quantidade secretada e acumulada pelo ofídio na natureza, razão pela qual atribuímo-lhe o valor relativo igual a 100,00.

Kochva[10], admite que a considerável quantidade de veneno encontrada nas glândulas de serpentes extraídas no inverno se deva ao armazenamento do produto sintetizado durante o verão precedente, e que a crença popular de que uma serpente venenífera é menos perigosa no inverno, seria possível, menos pela carga de veneno de suas glândulas, que a lentidão de movimentos do animal, durante esse período do ano.

Corroborando ao que admite Kochva[10], a primeira extração, quer pelo procedimento de compressão manual das glândulas, quer através de des-



carga elétrica, apresentou a maior quantidade de veneno, isto é, 42,25 mg e 47,99 mg, respectivamente.

A Tabela 3 expressa resultados mediante os quais ressalta a maior produtividade, em miligramas, do veneno *B. jararaca* extraído no verão, pelo processo manual, considerado em termos médios/exemplar; ao contrário, portanto, do que se verifica no inverno onde a maior produção de veneno deu-se com a extração pelo processo elétrico, conforme o exposto pela Tabela 2.

Nesta oportunidade foi considerado valor relativo igual a 100,00, a primeira extração pelo processo manual, considerando, como o foi para a primeira extração elétrica efetuada no inverno, isto é, admitindo ser a carga de veneno contida nas glândulas venenÍferas secretada pela serpente em condições naturais de vida livre.

E de se notar que o maior rendimento de produção de veneno ocorre nas terceiras extrações, manual e elétrica, respectivamente 62,79 mg (valor relativo igual a 152,22%) e 41,43 mg (valor relativo correspondente a 100,44%).

Se a diferença entre as médias gerais das extrações realizadas no inverno e no verão pelo processo manual, foi de, aproximadamente, 20,0 mg, precisamente 19,81 mg, o mesmo não se verificou quanto ao processo elétrico que foi, praticamente, nulo, ou seja, de apenas 0,62 mg, demonstrando que durante o inverno o processo de extração de veneno não apresentou diferença significativa para a produção, enquanto que no verão seria mais recomendável utilizar-se do meio manual de extração de peçonha.

A Tabela 4 apresenta resultados, expressos em termos do DL 50, para camundongos inoculados pela via intraperitoneal, demonstrando que a toxicidade do veneno de *B. jararaca* não varia significativamente ($p>0,05$), seja entre os métodos de extração empregados, seja entre as diferentes estações do ano. Rolim-Rosa e cols.[13] verificaram que as serpentes do gênero *Crotalus* - *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* produzem peçonha mais tóxica quando obtida pelo processo manual.

TABELA 1

Mortes de *Bothrops jararaca* após extrações de veneno pelos processos elétrico e manual, durante o inverno e o verão

Estação / Extração	Inverno			Verão	
	Ordem	Vivos	Mortos (1%)	Vivos	Mortos (%)
Elétrica	1.ª	49	10(16,95)	60	0(0,00)
	2.ª	46	3(5,08)	57	3(5,00)
	3.ª	46	0(0,00)	55	2(3,33)
	4.ª	38	8(13,56)	53	2(3,33)
	Total	38	(21(35,59)	53	7(11,67)
Manual	1.ª	52	8(13,33)	59	1(1,67)
	2.ª	47	5(8,33)	59	0(0,00)
	3.ª	44	3(5,00)	57	2(3,33)
	4.ª	43	1(1,67)	52	5(8,33)
	Total	43	17(28,33)	52	8(13,33)

SciELO

TABELA 2

Produção média, por exemplar, em miligramas de veneno de *Bothrops jararaca*, verificada durante o inverno, através de processo de extração elétrico e manual[1]

Extração / Ordem	Elétrica		Extração Manual	
	Quantidade de veneno (mg)	Produção relativa*	Quantidade de veneno (mg)	Produção relativa*
1.ª	47,99	100,00	42,25	88,04
2.ª	33,55	69,91	31,14	64,89
3.ª	34,14	71,14	27,46	57,22
4.ª	34,52	71,93	40,61	84,62
Média **	37,55		35,37	

* Produção relativa (1.ª extração elétrica = 100)
** Diferença não significativa ($p > 0,05$)

TABELA 3

Produção média, por exemplar, em miligramas de veneno de *Bothrops jararaca*, verificada durante o verão, através de processo de extração elétrico e manual

Extração / Ordem	Manual		Elétrica	
	Quantidade de veneno (mg)	Produção relativa*	Quantidade de veneno (mg)	Produção relativa*
1.ª	41,25	100,00	32,03	77,65
2.ª	55,78	135,22	35,75	86,67
3.ª	62,79	152,22	41,43	100,44
4.ª	60,90	147,64	38,52	93,38
Média **	55,18		36,93	

* Produção relativa (1.ª extração manual = 100)
** Diferença significativa ($p < 0,05$)

TABELA 4

Variação da atividade tóxica do veneno de *Bothrops jararaca*, em função do processo de extração empregado no inverno e no verão, em termos de DL50 para camundongos inoculados pela via peritoneal e observados em 24 e 48 horas após a inoculação

Estação / Extração	Inverno			Verão	
	Ordem	DL 50 em μg (24h)	DL 50 em μg (48h)	DL 50 em μg (24h)	DL 50 em μg (48h)
Elétrica	1.ª	61,31	61,31	51,60	51,60
	2.ª	46,00	46,00	41,10	41,10
	3.ª	47,42	46,49	44,58	43,37
	4.ª	33,30	33,30	45,50	45,50
	Média*	47,00	46,77	45,69	45,39
Manual	1.ª	46,00	46,00	49,50	44,50
	2.ª	38,55	36,32	51,92	50,45
	3.ª	49,75	47,87	36,42	36,42
	4.ª	35,30	35,30	35,70	35,00
	Média*	44,90	43,85	43,37	41,59

* Diferença não significativa ($p > 0,05$).

CONCLUSÕES

1. O maior número de mortes de exemplares de *Bothrops jararaca,* após extrações de veneno realizadas pelos processos elétrico e manual, durante o inverno e o verão, a intervalos de vinte e um dias, foi registrado no inverno.
2. Tanto no inverno quanto no verão, o registro do maior contingente de baixas verificou-se após a primeira extração, elétrica ou manual.
3. O maior rendimento médio de veneno de *Bothrops jararaca,* foi obtido por extração manual efetuada no verão.

ABSTRACT: For the present study, 240 snakes of the species *Bothrops jararaca* were used: 120 in winter and 120 in summer. These groups were submitted to different assays: In winter, the venom of 60 snakes was obtained by electrical stimulation of the glands at four different times; other 60 snakes by manual extraction at the same intervals. Another group of 120 snakes was submited to the same process however in summer. It was verified that the highest number of deaths after 4 extractions occurred in winter by electrical stimulation (35,59%). As to the venom production, the highest amount of venom was obtained in summer by the manual process.
KEYWORDS: *Bothrops jararaca-venom.* Toxicity, production. Influence of season.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANCHER, W.; ROLIM-ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de *Mus musculus Linnaeus,* 1758. *Mem. Inst. Butantan, 37:*139-148, 1973.

2. BELLUOMINI, H.E. Extraction and quantities of venom obtained from some brazilien snakes. In: BUCHERL, W & BUCKLEY, E., ed. *Venomous animals and their venoms.* New York, Academic Press, 1968. p. 97-117.
3. BERTRAND, G. & VLADESCO, R. Sur la variation cyclique annuelle du toxicité du sang de la vipèra. *Ann. Inst. Pasteur, 68*:51, 1942.
4. INSTITUTO BUTANTAN. Atualização em acidentes por animais peçonhentos. São Paulo, 1984. 66p.
5. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. *ed.* São Paulo, Indústria Gráfica Siqueira, 1959. 1265 p.
6. FONSECA, F. *Animais Peçonhentos.* S. Paulo, Empresa Gráfica da "Revista dos Tribunais Ltda", 1949. 376p.
7. FURLANETTO, R.S. *Emprego de camundongos tratados com doses preparatórias de venenos botrópicos para avaliação de DL50 desses venenos.* S. Paulo, 1965 (Tese — Faculdade de Odontologia da USP).
8. FURLANETTO, R.S.; ROLIM-ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y.Q. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculus* Linnaeus 1758. I. Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação de DL50. *Mem. Inst. Butantan, 37*:99-107, 1973.
9. GUBENCEK, F.; SKET, D.; TURK, V. & LEBEZ, D. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon, 12*:167-171, 1974.
10. KOCHVA, E. A quantitative study of venom secretion by *Vipera palestinae. Amer. J. trop. Med. Hyg., 9*:381-390, 1960.
11. MILLER, L.C. & TAINTER, M.L. Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic probigraph paper. *Proc. Soc. exp. Biol. Med., 57*:261-264, 1964.
12. REED, L.J. & MüENCH, H. A simple method estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg., 27*(3):493-497, 1938.
13. ROLIM-ROSA, R.; BELLUOMINI, H.E.; SILES VILLARROEL, M. & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações elétrica e manual. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:245-251, 1980/81.
14. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: VERONESI, R. ed. *Doenças Infecciosas e Parasitárias.* 4.ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 1978.
15. SCHENBERG, S.; PEREIRA LIMA, F.A.; SCHIRIPA, L.N. & NAGAMORI, A. Regeneração não paralela dos componentes do veneno de serpentes em extrações sucessivas. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 22, Salvador, 1970. Resumos. São Paulo, Empresa Gráfica Revista dos Tribunais S.A., 1970, p. 385.
16. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-323, 1978/79.
17. ZAR, J.H. *Biostatistical analysis.* London, Prentice-Hall Inc., 1974. 620 p.

Recebido para publicação em 04/6/1987 e aceito em 25/2/1988.



ARTE-FINAL, COMPOSIÇÃO,
FOTOLITOS E IMPRESSÃO


IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
Rua da Mooca, 1921 Fone: 291 3344
Vendas, ramais: 257 e 325
Telex 011 34557 DOSP
Caixa Postal 8231 São Paulo
C.G.C. (M.F.) N.º 48.066.047/0001-84

GOVERNO QUÉRCIA


INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: Página de rosto: título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. Texto: introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos (antes da referência bibliográfica). Material de referência: resumos (em português e inglês); palavras-chave (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês); Referências bibliográficas.
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41**: 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha a parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitirem sua reprodução dentro de uma página normal da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 50 (cinqüenta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 40 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page**: with article title, name of author(s), professional address. **Text**: with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, summary (in Portuguese and English), and key-words. A maximal number of 03 key-words should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.º, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41**: 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure or photograph the name of the author(s) should be lighly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Fifty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.

ISSN 0073 - 9901



IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
SÃO PAULO — BRASIL
1988

GOVERNO QUÉRCIA

